

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-194824

(43)Date of publication of application : 09.07.2003

(51)Int.Cl.

G01N 33/58
C07H 19/10
C09K 11/06
C12Q 1/68
G01N 21/78

(21)Application number : 2001-394480

(71)Applicant : TOYOBO CO LTD
MATSUMOTO KAZUKO

(22)Date of filing : 26.12.2001

(72)Inventor : TSUJI KATSUMI
NISHIYA YOSHIKI
TEJIMA SHINICHI
MATSUMOTO KAZUKO

(54) FLUORESCENT MATERIAL AND FLUORESCENT LABELING METHOD

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a fluorescent material usable as a fluorescent labeling probe preparing reagent having high fluorescent intensity, and superior fluorescent stability, and a chromosome diagnosing reagent such as CGH (Comparative Genomic Hybridization).

SOLUTION: This fluorescent material is expressed by a general formula (1) L_n-S-N (in the equation, L_n represents N,N,N1,N1-[2,6-bis(3'-amino methyl-1'-pyrazolyl)-4-phenyl pyridine] tetrakis (an acetic acid) or its derivative, S represents a spacer molecule, and N represents nucleotide, respectively).



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

30.11.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

THIS PAGE BLANK (USPTO,

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2003-194824
(P2003-194824A)

(43) 公開日 平成15年7月9日 (2003.7.9)

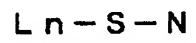
(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
G 0 1 N 33/58		G 0 1 N 33/58	A 2 G 0 4 5
C 0 7 H 19/10		C 0 7 H 19/10	2 G 0 5 4
C 0 9 K 11/06		C 0 9 K 11/06	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A 4 C 0 5 7
G 0 1 N 21/78		G 0 1 N 21/78	C
		審査請求 未請求 請求項の数9	O L (全 8 頁)
(21) 出願番号	特願2001-394480(P2001-394480)	(71) 出願人	000003160 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
(22) 出願日	平成13年12月26日 (2001. 12. 26)	(71) 出願人	592222352 松本 和子 東京都世田谷区代沢3-9-12-105
		(72) 発明者	辻 勝巳 福井県敦賀市東洋町10-24 東洋紡績株式 会社敦賀バイオ研究所内
		(74) 代理人	100080791 弁理士 高島 一
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 蛍光性物質および蛍光標識方法

(57) 【要約】

【解決手段】 一般式 (I)

【化1】



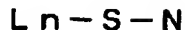
(式中、 L_n はN, N, N^1 , N^1 -[2, 6-ビス (3'-アミノメチル-1'-ピラゾリル)-4-フェニルピリジン] テトラキス (酢酸) またはその誘導体を、Sはスペーサー分子を、Nはヌクレオチドをそれぞれ示す) で表わされる蛍光性物質。

【効果】 高い蛍光強度、優れた蛍光安定性を有する、蛍光標識プローブ調製用試薬およびC G H (Comparative Genomic Hybridization) 等の染色体診断用の試薬として使用可能な蛍光性物質を得ることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式(1)

【化1】



(式中、LnはN, N, N¹, N¹-[2, 6-ビス(3'-アミノメチル-1'-ピラゾリル)-4-フェニルピリジン]テトラキス(酢酸)またはその誘導体を、Sはスペーサー分子を、Nはヌクレオチドをそれぞれ示す)で表される蛍光性物質。

【請求項2】 スペーサー分子が炭素と炭素の間に7以下のアミド結合を有していてもよい炭素数3以上25以下の二価の脂肪酸炭化水素基である、請求項1記載の蛍光性物質。

【請求項3】 スペーサー分子が-NH-CH₂-CH=C₂H₅である請求項2記載の蛍光性物質。

【請求項4】 スペーサー分子がヌクレオチドのプリンまたはピリミジン部分に結合している請求項1記載の蛍光性物質。

【請求項5】 ヌクレオチドがdUTPである請求項1記載の蛍光性物質。

【請求項6】 請求項1~5のいずれかに記載の蛍光性物質にランタノイド金属イオンが配位してなる蛍光錯体。

【請求項7】 ランタノイド金属イオンが、ユウロピウム、サマリウム、テルビウムおよびジスプロシウムのイオンから選ばれる少なくとも一種である請求項6記載の蛍光錯体。

【請求項8】 請求項1~5のいずれかに記載の蛍光性物質をヌクレオチド鎖中に取り込ませる工程、該蛍光性物質にランタノイド金属イオンを配位させる工程を含む、ヌクレオチド鎖の蛍光標識方法。

【請求項9】 ランタノイド金属イオンが、ユウロピウム、サマリウム、テルビウムおよびジスプロシウムのイオンから選ばれる少なくとも一種である請求項8記載のヌクレオチド鎖の蛍光標識方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、核酸の標識および検出に有用な新規蛍光性物質および該蛍光性物質の利用方法に関する。

【0002】

【従来の技術】生物学的高分子の非アイソトープ標識におけるランタノイド金属イオンキレートの使用は、基礎研究の分野および診断の分野において大きな関心を集めている。この技術は、目的のシグナルを圧倒する通常の蛍光バックグラウンドに比較して長く持続するランタノイド元素の蛍光の利益を受けることができる。特に、バックグラウンド蛍光の蛍光崩壊時間がナノ秒オーダーであるのに対して、三価ランタノイドイオンであるユウロピウム〔Eu(III)〕、テルビウム〔Tb(III)〕および

サマリウム〔Sm(III)〕は実にミリ秒オーダーの蛍光崩壊時間を有する。

【0003】適切な波長およびエネルギーレベルにおいて、サンプルに照射することによりバックグラウンド蛍光は既に崩壊しているが、ランタノイドを利用した標本はなお発光しているというタイムラグを利用して当該蛍光を測定することができる。この技術は、時間分解分光法として知られている。この技術の原理については、米国特許第4,150,295号および4,058,732号ならびに、Immunofluorescence and Related Staining Techniques, Knapp et al. eds. (1978: Elsevier/North Holland Biomedical Press)に詳述されている。

【0004】ランタノイドイオンの蛍光性は、一般にそれらがキレート剤によって捕獲される時に増強される。これは、水溶液中イオンの水和が放出エネルギーを劇的に消失するからである。キレート化はまた、当該イオンを検出すべき標的の近傍へ運ぶためにも必要である。

【0005】例えば、標的に対する結合特異性を有する抗体のような蛋白質、あるいは特異性相補核酸配列へハイブリダイズする核酸にキレート剤を共有結合させる方法が知られている。より具体的には、WO89/04375 (Mussio)には、式NH(C=S)NH、NH(C=O)NH、S(C=S)NH等の末端基を有するリンカー分子により、EDTA、DTPAおよびp-フェニルEDTAのようなキレート剤およびそれらの類縁体によるDNAプローブの標識について開示されている。当該プローブはランタノイドイオンと配位し、感度を増大するためミセル中のβ-ジケトンを利用する。同様にWO88/02784 (Ylikoski)は、修飾したEDTAおよびDTPAタイプのキレート剤を有する多キレート標識ポリマープローブを開示している。WO90/00550 (Kankare)は、ランタノイドイオンに対しキレート剤として作用し、そして核酸プローブおよび蛋白質の標識に使用し得る新規なテルビリジン誘導体を開示している。EP0324323 (Hemmila)は、窒素、酸素、リンまたはイオウから選ばれた自由電子対を有するヘテロ原子を含む構造を有し、そしてパイ結合の共役系への自由電子対が非局在化されるように結合された、均質アクセシ系に有用なキレートを開示している。WO90/00623 (Kwiatkowski)は、多数ジカルボン酸基の担体としてピリジン構造を有するキレートを使用する、多標識核酸プローブシステムを開示している。

【0006】種々のキレート剤の性質は、それらが結合する生物学的高分子のタイプに応じて異なる。例えば、モノ置換アミノトリアジンリガンド分子は、抗体のような蛋白質へ結合した場合、希土類イオンと効率的に結合するが、核酸プローブアクセシにおいて重大な制限がある。蛋白質標識の環境において、リガンドはイオン結合の助けとなる立体配座構造を与える多数の部位において結合する。例えばグルタミン酸の遊離カルボキシル基のような天然のカルボキシル基はキレート化を促進する。

しかしながら線状分子のような挙動を示す核酸ではそのような立体配座構造における相互作用は不可能である。このように、どのキレート構造が核酸プローブアッセイにおいて特別の有効性を有するかは自明でもないし、予測不可能である。

【0007】核酸プローブアッセイは、DNA/RNA配列の配列特異的検出の方法として依然主流を占めている。これは、検出すべきDNA/RNAの相補的配列領域を有する遺伝子プローブ配列のハイブリッド形成に基づいている

〔J. A. Matthews, L. J. Kricka, *Analytical Biochemistry* 169, 1-25 (1988); U. Landegren, R. Kaiser, C. T. Caskey, L. Hood, *Science* 242, 229 (1988)〕。診断の分野では、核酸プローブアッセイにより、感染症および遺伝的欠陥の検出が可能になる。核酸プローブアッセイを広く適用するための前提条件は、検出に適した感度、実行の単純さおよび放射性の回避である。

【0008】核酸プローブアッセイの1つの方法は、検出すべきDNA/RNAの相補的核酸配列を有する遺伝子プローブへの光化学的標識とハイブリダイゼーションを伴う〔N. Datta Gupta, P. M. M. Rae, E. D. Huquene, E. Carlson, A. Lyqa, J. S. Shapiro, J. P. Albarella, *Analytical Biochemistry* 177, 85 (1989); J. P. Albarella, R. L. Minegar, W. L. Patterson, M. Dattagupta, E. Carlson, *Nucleic Acids Research* 17, 4293 (1989)〕。遺伝子プローブは通常ビオチン化されており、検出すべきDNA/RNAと相補的核酸配列を有する遺伝子プローブのハイブリッド形成および分離段階の後、例えばアビジンあるいはストレプトアビジンとアルカリホスファターゼの複合体の添加により検出を行う。検出のために、次の段階でアルカリホスファターゼにより誘導される発色または発光反応を行う〔J. J. Leary, D. J. Brigati, D. C. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4045-4049 (1983)〕。当該ビオチンを用いた検出系の欠点の1つに、生物系にビオチンが広く分布していることが挙げられる。

【0009】可能な変法は、例えば検出すべきDNA/RNAあるいは遺伝子プローブの、蛍光性物質を用いた直接光化学的標識である。この際、ランタノイド金属イオンキレートを蛍光性物質として使用することにより、先に述べた理由から優れた標識方法が導かれることが期待される。

【0010】ランタノイド金属イオンキレートとしては、LKBシステムで用いられるβ-ジケトン型キレート剤、芳香アミン型キレート剤(BCPDA系キレート剤)があり、これらの流用をまず考慮すべきである。LKBシステムでは、標識試薬(例えばEuキレート標識抗体)を単体として用いても、標識試薬と抗原などのタンパク質が結合した状態で用いても、蛍光を発光することができないため、抗原の濃度を測定するために、増強剤として2-ナフトイルトリフルオロアセトンとトリ-n-オクチ

ルホスフィンオキサイドとトリトンX-100溶液を加えて、水溶液中にEu(III)を遊離させた後、Eu(III)キレート-ミセルの状態にして蛍光を測定する必要がある。

【0011】しかし、この方法は、例えば核酸プローブアッセイに適用した場合、次のような問題点がある。第一に、環境(試料、試薬、空気等)からの汚染を受けやすいという欠点がある。すなわち、水溶液中に遊離したEu(III)と十分に反応させるために、過剰の増強剤を加える必要があり、この過剰の増強剤が環境(空気、試料等)中のユウロピウムと反応し、核酸の濃度が実際より高く測定されてしまう。第二に、高分子と蛍光性物質が結合した状態では、蛍光を発することができないため、測定操作手順中に増強試薬を加える操作が必要であること、および、水溶液中でないと蛍光発光の可能な物質とならず、固相測定ができないという欠点がある。

【0012】上記芳香アミン型標識試薬(BCPDA系標識試薬)に用いる蛍光性物質としては、4,7-ビス(クロロスルホフェニル)-1,10-フェナントロリン-2,9-ジカルボン酸(BCPDA)、ビスクロロスルホフェニルフェナントロリンジカルボン酸等が挙げられる。しかし、芳香アミン型標識試薬を用いた場合、上記β-ジケトン型標識試薬を用いたLKBシステムと比較して、蛍光強度が1/100~1/200と弱い。蛍光強度が弱いと、測定対象の高感度な定量ができない。すなわち、検出限界が高く、かつ低濃度域までの測定ができない。蛍光強度を高めるために、特開平2-88968号公報には多重標識型の改良した標識試薬が開示されているが、十分な蛍光強度を得るには至っていない。

【0013】さらに、近年開発されたβ-ジケトン型標識試薬が、特開平4-244085号公報および特開平7-10819号公報に記載されている。しかし、これらの標識試薬についても、上記BCPDAを用いた芳香アミン型標識試薬と比較して、蛍光強度が1.4倍程と弱い。また、合成における工程数が多く、目標とする化合物の収率も良くない。本発明者らは先に、特定のキレート構造(4,4'-ビス(1",1",1",2",2",3",3"-ヘプタフルオロ-4",6"-ヘキサンジオン-6"-イル)クロロスルホ-オ-テルフェニル(以下BHCTと略す))を選択することにより、上記従来システムが有する問題点を克服し、蛍光強度が強く安定性の高い遺伝子プローブを調製し得る蛍光性物質を発明した(特開2001-247857号公報)。しかし、BHCT関連化合物の錯体を安定した形で存在させるには、水溶液中に小過剰のEuCl₃を存在させる必要があり、検出時にバックグラウンドが上昇するなどの問題を生じる場合がある。

【0014】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、遺伝子の解析に役立つ蛍光性物質および該蛍光性物質を利用

した核酸の標識方法を提供することにある。

【0015】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成するため鋭意検討した結果、特定のキレート構造を選択することにより、過剰の金属イオンの共存を必要とせず、蛍光強度が強く安定性の高い遺伝子プローブを調製し得る蛍光性物質が得られることを見出し、また、その利用方法を確立して本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は以下の通りである。

(1)一般式(1)

【0016】

【化2】

L_n-S-N

【0017】(式中、 L_n はN、N、 N^1 、 $N^1-[2,6-ビス(3'-アミノメチル-1'-ピラゾリル)-4-フェニルピリジン]$ テトラキス(酢酸)またはその誘導体を、Sはスペーサー分子を、Nはヌクレオチドをそれぞれ示す)で表される蛍光性物質。

(2)スペーサー分子が炭素と炭素の間に7以下のアミド結合を有していてもよい炭素数3以上25以下の二価の脂肪酸炭化水素基である、上記(1)記載の蛍光性物質。

(3)スペーサー分子が $-NH-CH_2-CH=CH-$ である上記(2)記載の蛍光性物質。

(4)スペーサー分子がヌクレオチドのプリンまたはピリミジン部分に結合している上記(1)記載の蛍光性物質。

(5)ヌクレオチドがdUTPである上記(1)記載の蛍光性物質。

(6)上記(1)～(5)のいずれかに記載の蛍光性物質にランタノイド金属イオンが配位してなる蛍光錯体。

(7)ランタノイド金属イオンが、ユウロビウム、サマリウム、テルビウムおよびジスプロシウムのイオンから選ばれる少なくとも一種である上記(6)記載の蛍光錯体。

(8)上記(1)～(5)のいずれかに記載の蛍光性物質をヌクレオチド鎖中に取り込ませる工程、該蛍光性物質にランタノイド金属イオンを配位させる工程を含む、ヌクレオチド鎖の蛍光標識方法。

(9)ランタノイド金属イオンが、ユウロビウム、サマリウム、テルビウムおよびジスプロシウムのイオンから選ばれる少なくとも一種である上記(8)記載のヌクレオチド鎖の蛍光標識方法。

【0018】本発明は、大量の非均質核酸の存在下、サンプル中に少量存在する核酸を検出するためのハイブリダイゼーションアッセイに使用することができる。すなわち、キレート結合ヌクレオチドを含む遺伝子プローブが標的核酸配列へハイブリダイズし、信号手段によって発生した信号を測定することによってハイブリダイゼーションの程度を検出する。かくして相補核酸を検出する

ためのアッセイに使用することができる。それ故、本発明の一目的は、極めて高レベルの蛍光強度を有し、高い安定性を有する遺伝子プローブを得ることである。

【0019】本発明の他の目的は、どんな核酸配列へも普遍的に結合できる蛍光性物質を提供することである。

【0020】さらに本発明の他の目的は、本発明の蛍光性物質の利用方法、すなわち核酸の蛍光標識方法を提供することである。

【0021】本発明において「蛍光性物質」とは、金属イオン、特にランタノイド金属イオンに配位して錯体となったときに錯体由来の蛍光、特に該金属イオン特有の蛍光を発することのできる化合物をいう。

【0022】本発明において、「誘導体」とは、基本構造に官能基等の化合物を置換もしくは付加せしめるよう合成されたものを意味する。より具体的にはN、N、 N^1 、 $N^1-[2,6-ビス(3'-アミノメチル-1'-ピラゾリル)-4-フェニルピリジン]$ テトラキス(酢酸)〔N,N,N',N'-[2,6-bis(3'-aminomethyl-1'-pyrazolyl)-4-phenylpyridine]tetrakis(acetic acid)；以下BPTAとも略す〕の誘導体としては、テトラエチルN、N、 N^1 、 $N^1-[2,6-ビス(3'-アミノメチル-1'-ピラゾリル)-4-フェニルピリジン]$ テトラキス(アセテート)等が挙げられる。

【0023】本発明において「スペーサー分子」とは、一般式(1)で表される蛍光性物質において L_n 、すなわちN、N、 N^1 、 $N^1-[2,6-ビス(3'-アミノメチル-1'-ピラゾリル)-4-フェニルピリジン]$ テトラキス(酢酸)またはその誘導体、およびN、すなわちヌクレオチドの両者に結合可能であり、当該結合によりそれらをつなぐことができる二価の基であれば特に限定されない。好適なスペーサー分子として、炭素と炭素の間に7以下のアミド結合を有していてもよい炭素数3以上25以下の二価の脂肪酸炭化水素基が挙げられる。さらに具体的には、 $-NH-CH_2-CH=CH-$ 、 $-CH=CH-CO-NH-CH_2-CH_2-NH-(CO-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH)-$ 、 $-CH=CH-CH_2-NH-CO-(CH_2)-$ 、 $-NH-$ 等が挙げられる。

【0024】本発明の蛍光性物質に含められるヌクレオチドとしては、種々のデオキシリボヌクレオチド(dATP、dGTP、dTTP、dCTP、dUTP)、種々のリボヌクレオチド(rATP、rGTP、rTTP、rCTP、rUTP)およびそれらの誘導体が挙げられる。ここで、誘導体とは、基本構造に官能基等の化合物を置換もしくは付加せしめるよう合成されたものを意味し、具体的にはdITP、ITP、7-deaza-dGTP等が挙げられる。

【0025】本発明で使用可能なランタノイド金属イオンとしては、ユウロビウム、サマリウム、テルビウム、ジスプロシウム等のイオンが挙げられる。一般的には塩

化物の形で使用されるが、測定に支障のない範囲で他の塩類の形態として使用することができる。本発明においてはこれらのランタノイド金属イオンを単独で、もしくは複数種混合して使用することができる。

【0026】本発明の蛍光性物質を取りこませるヌクレオチド鎖としては、上記種々のヌクレオチドが連続したヌクレオチド鎖（DNAやRNA）を使用することができる。具体的には、当該ヌクレオチド鎖としては、細胞内に発現するmRNAと特異的にハイブリッドを形成し得るcDNAあるいはアンチセンスオリゴヌクレオチド等が挙げられる。また、細胞内の核酸あるいは染色体の一部の特異的配列と相補的なヌクレオチド鎖を使用することができる。

【0027】一般式（I）

【0028】

【化3】

Ln-S-N

【0029】（式中、LnはN、N、N¹、N¹-[2, 6-ピス（3'-アミノメチル-1'-ビラゾリル）-4-フェニルピリジン]テトラキス（酢酸）またはその誘導体を、Sはスパーサー分子を、Nはヌクレオチドをそれぞれ示す）で表される蛍光性物質の合成方法は、既知の方法を利用することができる〔J. Yuan, G. Wang, K. Majima, K. Matsumoto, Analytical Chemistry 73, 1869-1876 (2001); P. R. Langer, A. A. Waldrop, D. C. Ward, Proceeding National Academics Science USA 78 (11), 6633-6637 (1891)〕。本発明者らが採用した方法は、実施例において詳細に説明するが、本発明は、蛍光性物質の合成方法に関して何ら限定されるものではない。

【0030】J. Yuan, G. Wang, K. Majima, K. Matsumoto, Analytical Chemistry 73, 1869-1876 (2001) にはBPTAまたはその誘導体の合成方法に関して詳述されている。また、BPTAを利用した免疫測定に関する先駆的研究について報告されている。

【0031】本発明の蛍光性物質は、上記BPTAまたはその誘導体が、スパーサー分子を介してヌクレオチド、特にプリンまたはピリミジン部分に結合したものである。BPTA（またはその誘導体）とスパーサー分子、ヌクレオチドとの結合は共有結合が好ましい。結合の際の各物質の量比については特に限定されない。使用する試薬、触媒および反応温度や時間等も特に制限されず、各反応工程に応じて適宜決定される。例えば、緩衝液としては炭酸水素ナトリウム、四ホウ酸ナトリウム、酢酸ナトリウム等が挙げられ、好ましくはpH8~9の緩衝液が用いられる。溶媒としては、BPTA（またはその誘導体）、スパーサー分子、ヌクレオチド等の反応に用いられる各成分が可溶であれば良く、アルコール類（メタノール、エタノール等）、炭化水素系（ヘキサン、ヘプタン、オクタン等）、エーテル系（ジエチルエ

ーテル、THF（テトラヒドロフラン）、MTBE（*t*-ブチルメチルエーテル）等）、ハロゲン系（クロロホルム、ジクロロエタン等）、芳香族系（トルエン、キシレン等）、DMF（ジメチルホルムアミド）、NMP（*N*-メチルピロリドン）等のいずれかあるいは複数の溶媒との混合系が挙げられる。BPTA（またはその誘導体）とスパーサー分子、ヌクレオチドとの結合の際にエステル化剤を用いる場合には、当該エステル化剤は、エステル化を促進させるものであれば特に制限されず、DCC（ジシクロヘキシルカルボジイミド）単独あるいは、補助剤としてピリジン、DMAP（ジメチルアミノピリジン）、PPy（ピロリジノピリジン）等と混合して使用することが好ましい。

【0032】本発明の蛍光性物質をヌクレオチド鎖中に取り込ませる工程は、試験管内酵素触媒ポリメライゼーションを利用することにより為される。具体的には、鋳型となる遺伝子DNAを基に、市販のDNAポリメラーゼを用いたニックトランスレーションまたは市販のニックトランスレーションキットを用いて取りこませる方法、市販の耐熱性ポリメラーゼを用いたポリメラーゼ・チェーン・リアクションまたはポリメラーゼ・チェーン・リアクション・キットを用いて取りこませる方法等がある。

【0033】本発明の蛍光錯体は、本発明の蛍光性物質にランタノイド金属イオンを配位させることによって調製される。当該配位工程としては、本発明の蛍光性物質を含む水溶液（緩衝液等）にランタノイド金属イオン、例えば適当な濃度のテルビウムイオンの水溶液（緩衝液）を加える方法が例示される。添加するランタノイド金属イオンの濃度は特に限定されないが、好ましくは $10^{-7} \sim 10^{-1} \text{ M}$ 、さらに好ましくは $10^{-8} \sim 10^{-2} \text{ M}$ である。

【0034】本発明のヌクレオチド鎖の蛍光標識方法において、ランタノイド金属イオンの蛍光性物質への配位は、当該蛍光性物質をヌクレオチド鎖に取りこませる前であっても後であってもかまわない。すなわち、上述の如く蛍光錯体とした後、当該蛍光錯体をニックトランスレーション法等を用いてヌクレオチド鎖に取り込んでも、当該蛍光性物質をニックトランスレーション法等を用いてヌクレオチド鎖に取りこませた後で、ランタノイド金属イオンを含む水溶液（緩衝液）等に浸漬することによって、当該金属イオンを配位させてもよい。

【0035】本発明の蛍光性物質を使用したこれらの工程を組み合わせることにより、本発明の蛍光標識方法が完成する。

【0036】

【実施例】以下、本発明を実施例にて具体的に且つ詳細に説明するが、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

【0037】実施例1

(1) BPTAの合成

BPTAの合成方法に関しては、J. Yuan, G. Wang, K. Majima, K. Matsumoto, Analytical Chemistry 73, 1869-1876 (2001)に従って合成した。4-アミノ-2,6-ジブロモピリジン3.7gからBPTA 0.43gを得た。

(2) BPTA-4-dUTPの合成

(2-1) Hg-dUTPの合成

dUTP-ナトリウム塩300mgを0.1M酢酸ナトリウム水溶液(pH=6.0)60mlに溶解した。酢酸水銀851.9mgを加え、50~55℃で4時間攪拌した。反応液を冷却した後、塩化リチウム203.98mgを加え、生成した塩化水銀を除くために反応液を酢酸エチルで洗浄し、5倍量のエタノールを加え-20℃で結晶を析出させた。この結晶を減圧濾過し、室温で減圧乾燥してHg-dUTPの白色結晶402.9mgを得た。

UV λ_{\max} : 267.2nm, λ_{\min} : 240.2nm

【0038】(2-2) アリルアミン-dUTPの合成

0.1M酢酸ナトリウム水溶液(pH=5.0)で20mMに調製したHg-dUTP 18.5mlに水2.7ml中のテトラクロロパラジウム(II)酸カリウム121.17mgを加え、次いで2Mアリルアミン水溶液(pH=7.0)2.22mlを加え室温で24時間攪拌した。この反応液を濾過して黒色固形のパラジウムを除去し、濾液をそのままカラムクロマト(DEAE Sephadex A-25; 酢酸ナトリウム水溶液(pH=8.5)の0.1-0.6Mグラジエント)にかけ、精製した。精製されている画分を合わせて5倍量のエタノールを加え、-20℃で結晶を析出させた。この結晶を減圧濾過し、室温で減圧乾燥してアリルアミン-dUTPの白色結晶59.9mgを得た。

10

20

30

*

* UV λ_{\max} : 284nm, 240nm, λ_{\min} : 264nm

【0039】(2-3) NHS-BPTAの合成

DMF 0.4ml中のBPTA 10mgおよびN-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS) 2mgを溶解した。この溶液にDCC(ジシクロヘキシルカルボジイミド) 3.57mgを添加し、室温で24時間攪拌した。濾過により析出した結晶を除去し、濾液を2回のトルエン共沸により濃縮した。析出した結晶をイソプロピルアルコール(IPA)洗浄濾過の後、減圧乾燥し、NHS-BPTAの白色結晶を17.5mg得た。

【0040】(2-4) BPTA-4-dUTPの合成

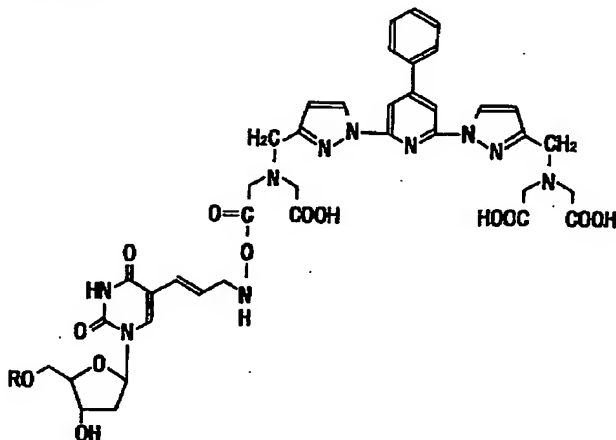
0.1M炭酸水素ナトリウム水溶液(pH=9.0)5ml中にアリルアミン-dUTP 60mgを溶解した。この溶液にDMF 2.5mlに溶解したNHS-BPTA 17.5mgを滴下し、室温で4時間攪拌した。この反応液にエタノール30mlを加え、-20℃で48時間放置し結晶を析出させた。この結晶を減圧濾過し、室温で減圧乾燥してBPTA-4-dUTPの白色結晶15mgを得た。また、減圧濾過後の濾液を濃縮し、エタノール5mlを加え、-20℃で72時間放置し2次結晶25mgを得た。ここで、BPTA-4-dUTPとはBPTAが、炭素と酸素と窒素の合計の原子数が4のスペーサー分子を介してdUTPと結合している、本発明の蛍光性物質を意味する。

UV λ_{\max} : 314nm, 268nm, λ_{\min} : 295nm

尚、BPTA-4-dUTPは下記構造式で表される。

【0041】

【化4】



R = triphosphate

【0042】(3) BPTA-4-dUTPを用いたニックトランスレーション

〔蛍光標識プローブの調製および長さの確認〕最初にB

50

PTA-4-dUTPを使用して蛍光標識プローブを調製した。蛍光標識プローブの調製にはVysis製のNick Translation kitを使用した。

11

蛍光標識プローブは、CGH Control DNA (MPE600) unlabeled (Vysis製 Cat. 32-800027) [200ng/μl]を5μl (DNA量として1μg)/10×Nick Translation Buffer (Kit添付)を5μl/0.1mM dNTP (-dTTP)を5μl/0.1mM dTTPを5μl/0.2mMのBPTA-4-dUTPを2.5μl/Nick enzymeを10μl/D. W. (nuclease-free water)で全量50μl、とし、各組成を混合およびスピンダウンし、15℃で60分間インキュベートさせて調製した。その後、電気泳動により長さの確認を実施した。電気泳動は1×TAEアガロースを使用し、反応液10μlを0.2μgのλ-HindIIIマーカーと共にアプライして実施し、プローブが9-2kbの長さになっていることを確認した。その後70℃、10分間熱処理してNick enzymeを熱失活させ、遮光して4℃に保存した。

【0043】(4)標識された遺伝子DNAの評価

(4-1)DNA蛍光標識プローブの単鎖化処理

次に蛍光標識プローブの単鎖化処理を実施した。単鎖化処理の手順として、10μgのHuman COT-1 DNA (Vysis製 Cat. 32-800028) [1μg/μl:10μl]/DNA蛍光標識プローブを10μl [200ng]/3M酢酸ナトリウム(pH5.2)を2μl/特級エタノール(ナカライ:Code. 147-13)50μlを十分に混合後、-80℃に20分間(一晚放置可能)放置した。放置後、4℃にて13,000rpm、30分間遠心を実施して上清を除去後、真空乾燥により沈澱を完全に乾燥させ、沈澱をマスターミックス10μl(50%ホルムアミド/2×SSC/10% dextran sulfate, pH7.0)中に十分にビベッティングにより溶解し、最終的にハイブリダイゼーション実施直前に75℃、5分間インキュベートさせて使用した。

【0044】(4-2)染色体標本の単鎖化処理

単鎖化処理した蛍光標識プローブとハイブリダイゼーションさせる染色体標本の単鎖化処理を、(4-1)と同時進行で実施した。まず最初に72℃に加温しておいたDenaturing solution (70%ホルムアミド/2×SSC, pH7.0)に必要な数の染色体標本スライドをいれ、2.5分間正確にインキュベートした。その後、予め-20℃に氷冷させておいた70%エタノール、85%エタノール、100%エタノールの順に2分間ずつ漬け、ドライヤー等を使用してAir dryして乾燥させた。乾燥終了後も、37℃のヒートブロック上に置き、(4-1)の蛍光標識プローブの単鎖化処理が終了するまで加温を続けた。

【0045】(4-3)ハイブリダイゼーション

単鎖化処理を実施した蛍光標識プローブ(75℃、5分

12

間インキュベート直後)を37℃、ホットプレート上で染色体標本スライドに全量滴下し、カバーガラスをかけて位置がずれないようにペーパーボンドで周囲を貼りつけた。その後、遮光して37℃ホットプレート上に10分間放置し、湿箱に入れて37℃で遮光して3日間ハイブリダイゼーションを実施した。

【0046】(4-4)ハイブリダイゼーション後の洗浄および染色

ハイブリダイゼーション後、ピンセットでカバーガラスの周囲に貼りつけたペーパーボンドを剥がし、45℃に加温しておいたWashing solution (50%ホルムアミド/2×SSC, pH7.0)に漬けて軽く揺らしながら7分間の洗浄を3回実施した。その後さらに、2×SSCにて45℃、7分間の洗浄を実施した。ついで室温でPN Bufferでの洗浄を5分間実施し、滅菌水で同じく室温、5分間の洗浄を実施した。次に染色体にハイブリダイズさせたBPTAを染色するため、染色用Buffer (50mM Tris-HCl, pH8.0/1×10⁻³M TbCl₃)をスライドガラスのハイブリダイゼーション実施個所に滴下し、カバーガラスをかけて遮光し、30分間染色した。その後、滅菌水にスライドガラスを入れ、再度室温で5分間の洗浄を実施した(この洗浄操作により、ハイブリダイゼーション実施個所以外の余分なバックグラウンドを除去することが可能である)。

【0047】(4-5)DAPI II染色、染色体蛍光発色確認

滅菌水をスライドガラスを振ってきり、乾燥しないうちにDAPI IIをハイブリダイゼーション実施個所に10μl滴下し、カバーガラスをかけて、位置がずれないようにマニキュアで周囲を貼りつけた。その後、室温で遮光して1時間程度放置した。DAPI II染色終了後、スライドガラスを蛍光顕微鏡(オリンパス:BX-60)にセットし、DAPI II専用のキューブ(励起波長330~385nm、蛍光波長420nm)で染色体の位置を確認し、BPTA専用キューブ(励起波長330~350nm、蛍光波長545nm)に切り換えて染色体像の蛍光発色を確認した。その結果、BPTA-4-dUTPを用いた蛍光標識プローブにて染色体の蛍光発色が確認された。

【0048】実施例2

(1)ランタノイド金属イオンが配位したBPTA-4-dUTPを用いたヌクレオチド鎖の標識

(1-1)テルビウムイオンの配位

1mMのBPTA-4-dUTP 20μlに50mM Tris-HCl (pH8.0)を20μl、10mM TbCl₃を10μl、D. W. (nuclease-free water)を50μl添加混合した。遮光し、室温で30分間放置した。

【0049】(1-2)ニクトランスレーション

CGH Control DNA (MPE600) unlabeled (Vysis製 Cat.32-800027) [200ng/μl]を5μl (DNA量として1μg)/10×Nick Translation Buffer (Kit添付)を5μl/0.1mM dNTP (-dTTP)を5μl/0.1mM dTTPを5μl/0.2mMのBPTA-4-dUTP (Tb³⁺配位)を2.5μl/Nick enzymeを10μl/D. W. (nuclease-free water)で全量50μl、とし、各組成を混合およびスピンドウンし、15℃で60分間インキュベートさせた。その後、電気泳動により作製したプローブが9-2kbの長さになっていることを確認した。その後70℃、10分間熱処理してNick enzymeを熱失活させ、遮光して4℃に保存した。

【0050】(2)標識された遺伝子DNAの評価

(2-1)DNA蛍光標識プローブの染色体標本へのハイブリダイゼーション

実施例1の(4-1)~(4-3)と同様の方法により、DNA蛍光標識プローブと染色体標本の単鎖化およびハイブリダイゼーションを行った。

【0051】(2-2)ハイブリダイゼーション後の洗浄
ハイブリダイゼーション後、ピンセットでカバーガラスの周囲に貼り付けたペーパーボンドを剥がし、45℃に加温しておいたWashing Solution (50%ホルムアルデヒド/2×SSC、pH7.0)に漬けて軽く揺らしながら7分間の洗浄を3回実施した。その後さらに、2×SSCにて45℃、7分間の洗浄を実*

*施した。ついで室温でPN Bufferでの洗浄を5分間実施し、滅菌水で同じく室温、5分間の洗浄を実施した。

【0052】(2-3)DAPI II染色、染色体蛍光発色確認

滅菌水をスライドガラスを振ってきり、乾燥しないうちにDAPI IIをハイブリダイゼーション実施個所に10μl滴下し、カバーガラスをかけて、位置がずれないようにマニキュアで周囲を貼り付けた。その後、室温で遮光して1時間程度放置した。スライドガラスを蛍光顕微鏡 (オリンパス: BX-60) にセットし、BPTA専用キューブ (励起波長330~350nm、蛍光波長545nm) で染色体像の蛍光発色を確認した。その結果、BPTA-4-dUTPを用いた蛍光標識プローブにて染色体の蛍光発色が確認された。

【0053】以上の結果より、本発明の蛍光性物質BPTA-4-dUTPは、従来の蛍光物質よりも蛍光強度が高く、なお且つ蛍光安定性に優れており、蛍光標識プローブ調製用試薬およびCGH (Comparative Genomic Hybridization) 等の染色体診断用の試薬として従来の蛍光物質との置き換えが可能である。また、PCRやシーケンス等のラベリング用試薬としての用途が今後期待される。

【0054】

【発明の効果】本発明の蛍光性物質、蛍光錯体および蛍光標識方法を利用することにより、蛍光強度が強く、安定性の高い遺伝子プローブの作製、高感度の核酸プローブアッセイが可能になる。

フロントページの続き

(72)発明者 西矢 芳昭

福井県敦賀市東洋町10-24 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 手嶋 真一

大阪府大阪市北区堂島浜2-2-8 東洋紡績株式会社本社内

(72)発明者 松本 和子

東京都世田谷区代沢3-9-12-105

Fターム(参考) 2G045 AA35 BB01 BB05 BB14 BB50

DA13 FB02 FB12 GC15

2G054 AA06 CA22 CE02 EA03 GA04

4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ52 QR56

QR66 QS34 QX02

4C057 BB02 DD03 LL14 LL22